

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Application Number : 10/691,653 Confirmation No. 7953  
Applicants : Jean-Louis ESCARY  
Filed : October 24, 2003  
Title : POLYPEPTIDES OF THE IFN $\alpha$ -17 GENE  
TC/Art Unit : 1647  
Examiner: : Jegatheesan SEHARASEYON  
Docket No. : 60711.000024  
Customer No. : 21967

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**

**MAIL STOP AMENDMENT**  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Applicant respectfully submits the certified copy of French Patent Application No. 01/05516, filed April 24, 2001, in connection with the above-identified patent application. Applicant claims priority benefits under 35 U.S.C. § 365(b) from this French Application in the above identified Application filed on October 24, 2003.

No fee is believed due as a result of this submission. However, if a fee is due upon the filing of this priority document, please charge such fee to the undersigned's **Deposit Account No. 50-0206**.


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Respectfully submitted,

HUNTON & WILLIAMS LLP

Dated: 4/7/06

By:

  
Robert M. Schulman  
Registration No. 31,196

Christopher J. Nichols, Ph.D.  
Registration No. 55,984

HUNTON & WILLIAMS LLP  
Intellectual Property Department  
1900 K Street, N.W., Suite 1200  
Washington, DC 20006-1109  
(202) 955-1500 (telephone)  
(202) 778-2201 (facsimile)

RMS/CJN:cdh

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **24 MARS 2006**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 190600

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>24 AVRIL 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0105516</b> DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>24 AVR. 2001</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>RINUY, SANTARELLI</b> <b>14, avenue de la Grande Armée</b> <b>75017 PARIS</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>(facultatif)</i> <b>BIF022983/FR</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b> Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date ____/____/____ Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Nouveaux polynucléotides et polypeptides du gène IFN $\alpha$ -17.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>	
<b>5 DEMANDEUR</b> Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Adresse   Rue   Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		<input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b> <b>GenOdyssee</b>  <b>Société Anonyme</b> _____ _____ <b>Parc d'Affaires Technopolis, 3 avenue du Canada, Bat Alpha,</b> <b>B.P. 810, LES ULIS</b> <b>91974   COURTABOEUF</b> <b>FRANCE</b> <b>FRANÇAISE</b>	

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2



Reservé

24 AVRIL 2001

75 INPI PARIS

N° d'INSTRUMENT

NATIFIAL ATTRIBUE PAR L'INPI

0105516

DB 510 W / 106 F C3

Vos références pour ce dossier :

(facultatif)

BIF022983/FR

## 6 MANDATAIRE

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N° de pouvoir permanent et/ou  
de lien contractuel

Adresse

Rue

Code postal et ville

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

RINUY, SANTARELLI

14 AVENUE DE LA GRANDE ARMEE

75017 | PARIS

01 40 55 43 43

## 7 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui☒ Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

## 8 RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat  
ou établissement différé☒☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui☐ Non9 RÉDUCTION DU TAUX  
DES REDEVANCES

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non imposition)☐ Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission  
pour cette invention ou indiquer sa référence) :Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,  
indiquez le nombre de pages jointes10 SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)

Thierry CAEN N°98.0600  
RINUY, SANTARELLIVISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI

M. ROCHET



5                    La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comportant des polymorphismes de type SNP dans la séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17 ainsi que de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.

10    ART ANTERIEUR

                  Le gène interféron alpha 17 (IFN $\alpha$ -17) est décrit dans les publications suivantes :

- Olopade et al. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia"; Genomics;  
15    14: 437-443; 1992.
- Lawn R. M. et al. ; "DNA sequence of two closely linked human leukocyte interferon genes"; Science 212 (4499), 1159-1162 (1981).

                  La séquence nucléotidique de ce gène est accessible sous le numéro d'accès V00532 dans la base de données GenBank.

20                Les interférons alpha humains (IFN $\alpha$ ) sont connus pour leurs effets anti-prolifératifs cellulaires et leurs implications dans les réponses anti-virales et anti-parasitaires.

                  Les IFN $\alpha$  sont aussi connus pour inhiber l'expression de plusieurs autres cytokines au niveau des cellules hématopoïétiques souches, ainsi que  
25    pour inhiber la prolifération cellulaire de certaines tumeurs.

                  Les IFN $\alpha$  sont également connus pour réduire l'expression des récepteurs de l'EGF dans les carcinomes rénaux, pour inhiber l'expression de certains gènes mitochondriaux, pour inhiber la prolifération des fibroblastes, des monocytes et des lymphocytes B, notamment *in vitro* et pour bloquer la  
30    synthèse des anticorps par les lymphocytes B.

                  Les IFN $\alpha$  sont également connus pour induire l'expression

d'antigènes spécifiques de tumeurs à la surface de cellules tumorales et également pour induire les gènes placés sous le contrôle de régions promotrices de type ISRE (Interferon-stimulated response element) en agissant sur les facteurs de transcription spécifiques de ces ISRE.

5 Il a été observé par ailleurs une immunisation dirigée contre les  $\text{INF}\alpha$  chez des patients atteints de certaines formes de pathologies auto-immunes ou d'infections virales généralisées ainsi que dans certains cancers.

Il est connu que les  $\text{INF}\alpha$  sont impliqués dans différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme,  
10 par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les  
15 infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses  
20 multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Les  $\text{INF}\alpha$  sont particulièrement utilisés pour le traitement des hépatites chroniques B et C, des leucémies telles que la leucémie à  
25 tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, des myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, de tumeurs carcinoïdes, de mélanomes malins, de carcinomes rénaux métastasés ainsi que des tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

30 Il est également connu que les  $\text{INF}\alpha$  sont aussi efficaces contre les tumeurs cancéreuses ou non. Les  $\text{INF}\alpha$  sont reconnus par la FDA (Food

and Drug Administration) pour le traitement des verrues génitales ou vénériennes.

Toutefois, les IFN $\alpha$  présentent de nombreux effets secondaires lorsqu'ils sont employés dans des compositions pharmaceutiques, tels que des  
5 réactions d'hypersensibilité aiguë (urticaire, broncho-constriction, choc anaphylactique, etc.), des arythmies cardiaques, des hypotensions artérielles, des crises d'épilepsie, des troubles des fonctions thyroïdiennes ou des syndromes pseudo-grippaux (fièvres, sueurs, myalgies).

La demanderesse a trouvé de nouveaux polypeptides et nouveaux  
10 polynucléotides analogues à l'IFN $\alpha$ -17, pouvant avoir une fonctionnalité différente de l'IFN $\alpha$ -17 naturel.

Ces nouveaux polypeptides et polynucléotides peuvent notamment être utilisés pour traiter ou prévenir les dérèglements ou maladies mentionnés précédemment et éviter tout ou partie des inconvénients qui leurs  
15 sont liés.

### L'INVENTION

L'invention a pour premier objet de nouveaux polynucléotides qui diffèrent de la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN $\alpha$ -  
20 17, en ce qu'ils comportent un ou plusieurs polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) fonctionnels.

La séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène IFN $\alpha$ -17 humain sauvage de référence est composée de 1873 nucléotides. Cette séquence comporte une séquence codante de 570 nucléotides, du nucléotide 639 (codon  
25 start) au nucléotide 1208 (codon stop).

La demanderesse a ainsi identifiée deux polymorphismes de type SNP fonctionnel dans la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN $\alpha$ -17.

Ces deux polymorphismes sont présentés ci-dessous :

1) Le nucléotide guanine (g) en position 771 de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence IFN $\alpha$ -17 est muté en cytosine (c).

Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après g771c.

5 2) Un nucléotide adénine (a) est inséré en position 808 dans la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 du gène sauvage de référence IFN $\alpha$ -17.

Ce polymorphisme de type SNP est appelé ci-après 808insA.

Ces polymorphismes de type SNP fonctionnel (au sens de la présente invention) ont été chacun identifiés par la demanderesse sur la base  
10 du procédé de détermination décrit dans sa demande de brevet FR 00 22894, intitulée "Procédé de détermination d'un ou plusieurs polymorphisme(s) fonctionnel(s) dans la séquence nucléotidique d'un gène candidat fonctionnel présélectionné et ses applications" et déposée le 6 décembre 2000, citée ici à titre de référence.

15 Le procédé décrit dans cette demande de brevet permet l'identification d'un (ou plusieurs) polymorphisme(s) de type SNP fonctionnel(s) préexistant(s) dans au moins un individu constitutif d'une population aléatoire d'individus.

Dans le cadre de la présente invention, des fragments de la  
20 séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17, comprenant la séquence codante, ont été isolés chez des individus dans une population d'individus choisis de manière aléatoire.

Un séquençage de ces fragments a ensuite été réalisé sur certains de ces échantillons présentant un profil hétéroduplex (différent de la  
25 séquence nucléotidique du gène sauvage de référence de l'IFN $\alpha$ -17) après analyse par DHPLC ("Denaturing-High Performance Liquid Chromatography"; Chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante).

On a alors comparé les fragments ainsi séquencés à la séquence nucléotidique du fragment du gène IFN $\alpha$ -17 sauvage de référence et identifié  
30 les polymorphismes de type SNP fonctionnels g771c et 808insA pouvant provenir d'individus différents.

Ainsi ces deux polymorphismes de type SNP fonctionnels sont naturels et chacun d'entre eux, ensemble ou séparément, est présent chez certains individus de la population mondiale.

Le gène IFN $\alpha$ -17 sauvage de référence code pour une protéine immature de 189 acides aminés, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, qui sera converti en protéine mature de 166 acides aminés, par clivage du peptide signal qui comprend les 23 premiers acides aminés.

Chacun des polymorphismes de type SNP de l'invention g771c et 808insA, entraînent des modifications de la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17 au niveau de la séquence d'acides aminés.

Ces modifications dans la séquence d'acides aminés sont les suivantes :

1) Le polymorphisme de type SNP g771c entraîne une mutation de l'acide aminé glycine (G) en position 45 dans la protéine immature du gène IFN $\alpha$ -17, correspondant à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, en arginine (R) et en position 22 de la protéine mature correspondante.

Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment G22R et G45R la mutation codée par ce polymorphisme de type SNP selon que l'on se réfère respectivement à la protéine mature ou à la protéine immature.

2) Le polymorphisme de type SNP 808insA entraîne une mutation de l'histidine (H) en position 57 dans la protéine immature codée par la séquence nucléotidique ID SEQ N°2 du gène IFN $\alpha$ -17 en glutamine (Q), et en position 34 de la protéine mature.

De plus, le décalage de la phase de lecture consécutive à l'insertion d'une adénine (a) en position 808 sur la séquence nucléotidique entraîne l'apparition d'un codon stop en position 58.

Le polymorphisme de type SNP 808insA entraîne donc également un arrêt de la traduction de la protéine juste après la glutamine 57.

La protéine immature ainsi codée est donc tronquée et ne comporte que 57 acides aminés.

Ce polymorphisme est ainsi appelé ci-après H57Q frame 57.

Dans la description de la présente invention, on appellera indifféremment H34Q frame 34 et H57Q frame 57 la mutation codée par ce polymorphisme de type SNP selon que l'on se réfère respectivement à la

5 protéine mature ou à la protéine immature.

La séquence d'acides aminés ID SEQ N°3 correspond à la protéine immature mutée (H57Q frame 57) codée par la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 comportant le polymorphisme de type SNP 808insA.

Chacun des polymorphismes de type SNP de l'invention entraîne

10 des modifications de la conformation spatiale des polypeptides conformes à l'invention par rapport au polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence IFN $\alpha$ -17.

Ces modifications peuvent être observées par modélisation moléculaire bio-informatique, selon des méthodes bien connues de l'homme du

15 métier mettant en œuvre, par exemple, les outils de modélisation *de novo* (par exemple, SEQFOLD/MSI), d'homologie (par exemple, MODELER/MSI), de minimisation des champs de force (par exemple, DISCOVER, DELPHI/MSI) et/ou de dynamique moléculaire (par exemple, CFF/MSI).

Un exemple d'une telle modélisation est donné ci-après dans la

20 partie expérimentale.

La modélisation bio-informatique permet d'observer que la mutation G22R sur la protéine mutée mature entraîne une modification et un déplacement de la boucle "AB" autour de la position 22 ce qui provoque la disparition de ponts hydrogène.

On peut observer sur les Figures 1 et 2 que cette boucle "AB" est

25 dépliée et protubérante.

Le résidu G22 sur la protéine IFN $\alpha$ -17 naturel est très proche du résidu R144. Or ce résidu R144 est connu pour être impliqué dans la liaison de l'interféron alpha-2 (IFN $\alpha$ -2) à son récepteur.

La structure de l'IFN $\alpha$ -2 étant très proche de celle de l'IFN $\alpha$ -17, il est très probable que ce même résidu dans l'IFN $\alpha$ -17 soit impliqué dans la liaison avec son récepteur.

Ainsi, la protéine mutée IFN $\alpha$ -17 G22R possède une conformation  
5 tridimensionnelle très différente de la protéine IFN $\alpha$ -17 naturel.

La modélisation bio-informatique permet ainsi de prévoir que la présence de l'acide aminé arginine en position 22 entraîne une modification significative de la structure et de la fonction de l'IFN $\alpha$ -17 naturel, notamment au niveau de la liaison l'IFN $\alpha$ -17 à son récepteur.

10 Un génotypage des polynucléotides conformes à l'invention peut également être effectué de façon à déterminer la fréquence allélique de ces polynucléotides dans une population.

La détermination de la fonctionnalité des polypeptides de l'invention peut également être effectuée par un test de leur activité biologique.

15 A cet égard, on peut mesurer, par exemple, l'effet anti-prolifératif sur la lignée cellulaire de Daudi de polypeptides conformes à l'invention en comparaison avec la protéine l'IFN $\alpha$ -17 naturel.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de polynucléotides et de polypeptides conformes à l'invention ainsi que de molécules thérapeutiques  
20 obtenues et/ou identifiées à partir de ces polynucléotides et polypeptide, notamment pour la prévention et le traitement de certains dérèglements et/ou maladies humaines.

La Figure 1 représente la modélisation de la protéine codée conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP g771c et de  
25 la protéine IFN $\alpha$ -17 naturel.

La Figure 2 représente la modélisation de la partie inférieure de chacune des protéines représentées sur la Figure 2.

Le ruban noir des Figures 1 et 2 représente la structure de la protéine IFN $\alpha$ -17 naturel.

30 Le ruban blanc des Figures 1 et 2 représente la structure de la protéine IFN $\alpha$ -17 mutée (g771c).

La Figure 3 représente la mesure de l'effet anti-prolifératif cellulaire de l'IFN $\alpha$ -17 naturel et de l'IFN $\alpha$ -17 mutée (G45R).

Sur cette Figure, les abscisses correspondent au logarithme de la concentration protéique en picomolaires (pM) et les ordonnées correspondent  
5 au pourcentage de prolifération cellulaire.

L'effet anti-prolifératif de l'IFN $\alpha$ -17 naturel est représenté par des carrés et l'effet anti-prolifératif de l'IFN $\alpha$ -17 muté (G45R) est représenté par des losanges.

## 10 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

### Définitions

On entend par "séquence nucléotidique du gène sauvage de référence", la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 du gène IFN $\alpha$ -17 humain.

Cette séquence est accessible dans la GenBank sous le numéro  
15 d'accès V00532 et décrite dans les publications suivantes :

- Olopade et al. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia"; Genomics; 14: 437-443; 1992.
- Lawn R. M. et al. ; "DNA sequence of two closely linked human leukocyte  
20 interferon genes"; Science 212 (4499), 1159-1162 (1981).

On entend par " IFN $\alpha$ -17 naturel" le polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence. La protéine immature de l'IFN $\alpha$ -17 naturel correspond à la séquence peptidique ID SEQ N°2.

On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un  
25 polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

Le terme polynucléotide inclut, par exemple, un ADN simple brin ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins, un ARN simple brin ou double brin et un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s)  
30 simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brins. Le terme polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs



régions triple brins. On entend également par polynucléotide les ADNs et ARNs contenant une ou plusieurs bases modifiées de façon à avoir un squelette modifié pour la stabilité ou pour d'autres raisons. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine.

5                    On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée, comme dans le cas des peptides isostères, par exemple.

                  Un polypeptide peut être composé d'autres acides aminés que les  
10 20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tel que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature. Ces modifications peuvent apparaître  
15 n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

                  Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-translation naturel ou synthétique, qui sont bien  
20 connus de l'homme du métier.

                  On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé  
25 lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le  
30 processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés telle que l'arginylation ou

l'ubiquitination. De telles modifications sont bien détaillées dans la littérature :  
PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2<sup>nd</sup> Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT  
MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New  
5 York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein  
cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 :626-646 et Rattan et al. "Protein  
Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci  
(1992) 663 :48-62.

On entend par "polynucléotide isolé" ou "polypeptide isolé" un  
10 polynucléotide ou un polypeptide tel que défini précédemment qui est isolé du  
corps humain ou autrement produit par un procédé technique.

On entend par "identité", la mesure d'identité d'une séquence  
nucléotidique ou polypeptidique.

L'identité est un terme bien connu de l'homme du métier et de la  
15 littérature. Voir COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed.,  
Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS  
AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York,  
1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M.  
and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994; et SEQUENCE  
20 ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987.

Les méthodes communément employées pour déterminer  
l'identité et la similarité entre deux séquences sont également bien décrites  
dans la littérature. Voir GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed,  
Academic Press, San Diego, 1994, et Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied  
25 Math (1988) 48 :1073.

Un polynucléotide ayant, par exemple, une identité d'au moins  
95 % avec la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 est un polynucléotide qui  
comporte au plus 5 points de mutation sur 100 nucléotides, par rapport à ladite  
séquence.

30 Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs)  
substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) nucléotide(s).

De même, un polypeptide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95 % avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2 est un polypeptide qui comporte au plus 5 points de mutation sur 100 acides aminés, par rapport à ladite séquence.

- 5 Ces points de mutation peuvent être une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s) et/ou délétion(s) d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s).

Les polynucléotides et les polypeptides conformes à l'invention qui ne sont pas totalement identiques avec respectivement :

- 10 - la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 (comportant au moins l'un des polymorphismes de type SNP g771c et 808insA),  
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 (comportant le polymorphisme de type SNP G45R), et  
- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°3 (comportant éventuellement le polymorphisme de type SNP G45R);  
15 sont considérés comme des variants de ces séquences.

Habituellement un polynucléotide conforme à l'invention possède la même, ou pratiquement la même activité biologique que la séquence nucléotidique ID SEQ N°1 comportant au moins l'un des polymorphismes de type SNP : g771c et 808insA.  
20

De même, habituellement un polypeptide conforme à l'invention possède la même, ou pratiquement la même activité biologique que :

- la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 (comportant le polymorphisme de type SNP : G45A), et/ou  
25 - la séquence d'acides aminés ID SEQ N°3 (comportant éventuellement le polymorphisme de type SNP : G45A).

Un variant, selon l'invention, peut être obtenu, par exemple, par mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On entend par "polymorphisme de type SNP", toute variation  
30 naturelle d'une base dans une séquence nucléotidique. Par extension, ce terme s'applique à une mutation dans une séquence d'acides aminés.

On entend par "polymorphisme de type SNP fonctionnel", un polymorphisme de type SNP compris dans une séquence nucléotidique ou une séquence d'acides aminés ayant une fonctionnalité.

On entend par "fonctionnalité", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide.

La fonctionnalité d'un polypeptide ou d'un polynucléotide conforme à l'invention peut consister en une conservation, une augmentation, une diminution ou une suppression de l'activité biologique du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence ou de cette dernière séquence nucléotidique.

La fonctionnalité d'un polypeptide ou d'un polynucléotide conforme à l'invention peut également consister en un changement de la nature de l'activité biologique du polypeptide codé par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence ou de cette dernière séquence nucléotidique.

L'activité biologique peut, notamment, être liée à l'affinité ou à l'absence d'affinité d'un polypeptide conforme à l'invention vis-à-vis d'un récepteur.

Plus particulièrement, les polynucléotides et les polypeptides conformes à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP g771c (G45R) présentent une activité anti-proliférative cellulaire des cellules de Daudi fortement inhibé par rapport à l'IFN $\alpha$ -17 naturel.

Cette activité anti-proliférative cellulaire est habituellement de 5 à 20 fois inférieure à celle de la protéine IFN $\alpha$ -17 naturel.

Cette activité peut notamment être mesurée conformément au test de l'exemple 2 de la partie expérimentale, ci-après.

### Polynucléotide

La présente invention a pour premier objet un polynucléotide isolé comprenant :

- a) une séquence nucléotidique ayant au moins 90 % d'identité, préférentiellement au moins 95 % d'identité et plus préférentiellement au

moins 99 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 639 au nucléotide 1208),

étant entendu que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

5 - g771c,

- 808insA, ou

b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

Conformément à la présente invention, la séquence nucléotidique  
10 sous a) peut comporter soit le polymorphisme de type SNP g771c, soit le polymorphisme de type SNP 808insA, soit les deux polymorphismes de type SNP g771c et 808insA.

Il est entendu, au sens de la présente invention, que la numérotation correspondant au positionnement des polymorphismes de type SNP g771c et  
15 808insA est relative à la numérotation de la séquence nucléotidique ID SEQ N°1.

La présente invention concerne également un polynucléotide isolé comprenant :

a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des  
20 polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,

- 808insA, ou

b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

25 Préférentiellement, le polynucléotide de l'invention consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune des séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,

30 - 808insA.

Selon l'invention, la séquence nucléotidique sous a) du



polynucléotide conforme à l'invention défini précédemment comporte préférentiellement au moins le polymorphisme de type SNP g771c.

La présente invention a aussi pour objet un polynucléotide isolé, codant pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
  - b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,
- étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP : G45R.

Il est entendu, au sens de la présente invention, que la numérotation correspondant au positionnement du polymorphisme de type SNP G45R est relative à la numérotation de la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé codant pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

Chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) du polynucléotide défini précédemment peut également comporter le polymorphisme de type SNP G45R.

Préférentiellement le polynucléotide conforme à l'invention est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

Un polynucléotide conforme à l'invention peut être obtenu par les méthodes standards de synthèse d'ADN ou d'ARN.

Un polynucléotide conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP g771c peut être obtenu par mutagenèse dirigée à partir de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 du gène IFN $\alpha$ -17 en modifiant le nucléotide g par le nucléotide c en position 771.

Un polynucléotide conforme à l'invention comportant le polymorphisme de type SNP 808insA peut être obtenu par mutagenèse dirigée à partir de la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 du gène IFN $\alpha$ -17 en insérant une adénine (a) en position 808.

5 Les procédés de mutagenèse dirigée qui peuvent ainsi être mis en œuvre sont bien connus de l'homme du métier. On peut notamment évoquer la publication de TA Kunkel en 1985 dans "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488.

Un polynucléotide isolé conforme à l'invention peut également comprendre, par exemple, des séquences nucléotidiques codant pour des  
10 séquences d'acides aminés pre-, pro- ou pre-pro-protéine ou des séquences d'acides aminés marqueurs, comme l'hexa-histidine peptide.

Un polynucléotide conforme à l'invention peut également être associé à des séquences nucléotidiques codant pour d'autres protéines ou fragments de protéines en vue d'obtenir des protéines de fusion ou à des fins  
15 de purification.

Un polynucléotide conforme à l'invention peut également comprendre des séquences nucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites ou non, des séquences traduites ou non, des séquences signal d'épissage, des séquences  
20 polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

On définit comme séquence nucléotidique complémentaire à la séquence nucléotidique un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette séquence nucléotidique, dans des conditions stringentes.

25 On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes d'hybridation" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences nucléotidiques ont une identité d'au moins 90 %, de préférence supérieure ou égale à 95 %, encore plus préférentiellement supérieure ou égale à 95 %.

30 Les conditions stringentes peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier et, par exemple, par une

incubation des polynucléotides, à 42° C, dans une solution comprenant 50 % de formamide, 5xSSC (150 mM de NaCl, 15 mM de trisodium citrate), 50 mM de sodium phosphate (pH = 7.6), 5x Solution Denhardt, 10 % de dextran sulfate et 20 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé, suivi d'un lavage des filtres à 5 0,1x SSC, à 65° C.

Dans le cadre de l'invention, lorsque les conditions stringentes d'hybridation permettent une hybridation des séquences nucléotidiques ayant une identité égale à 100 %, on considère que la séquence nucléotidique est strictement complémentaire à la séquence nucléotidique sous a), telle que 10 décrite plus haut.

Il est bien entendu au sens de la présente invention que la séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique comportent l'un au moins des polymorphismes de type SNP conforme à l'invention en anti-sens.

15 Ainsi, par exemple, si la séquence nucléotidique comporte le polymorphisme de type SNP g771c, sa séquence nucléotidique complémentaire comporte toujours le nucléotide g en position 771.

#### 20 Identification, hybridation et/ou amplification d'un polynucléotide comportant le polymorphisme de type SNP

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide défini précédemment, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante (du nucléotide 639 au 25 nucléotide 1208) étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,
- 808insA.



Génotypage et détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP

La présente invention a également pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide conforme à l'invention comme outil de génotypage.

- 5 La présente invention a aussi pour objet un procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide conforme à l'invention dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

10 Au sens de l'invention, on définit le génotypage comme un procédé de détermination du génotype d'un individu ou d'une population d'individus.

On entend par "population d'individus", un groupe d'individus déterminés de façon aléatoire ou non. Ces individus peuvent être des humains, des animaux, des micro-organismes ou des plantes.

- 15 Les individus peuvent être choisis selon leur ethnie ou selon leur phénotype, notamment ceux qui sont atteints par les dérèglements et/ou maladies suivantes : les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et  
20 des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier les infections virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie  
25 d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres  
30 gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention est préférentiellement génotypé dans une population d'individus.

Il existe de multiples technologies de pouvant être mises en œuvre pour génotyper des polymorphismes de type SNP génotypage (voir  
5 notamment Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, pp 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"). Ces technologies sont basées sur l'un des quatre principes suivants : hybridation d'oligonucléotides spécifiques d'allèles, élongation d'un oligonucléotide par des didésoxynucléotides en présence ou non de désoxynucléotides, ligation d'oligonucléotides spécifiques  
10 d'allèles ou clivage d'oligonucléotides spécifiques d'allèles.

Chacune de ces technologies peut être couplée à un système de détection comme, par exemple, la mesure de la fluorescence directe ou polarisée, ou la spectrométrie de masse.

Le génotypage peut notamment être effectué par un  
15 miniséquençage avec des ddNTPs chauds (2 ddNTPs différents marqués par des fluorophores différents) et froids (2 ddNTPs non marqués), en liaison avec un lecteur de fluorescence polarisé. Le protocole de miniséquençage avec lecture de fluorescence polarisée (Technologie FP-TDI ou Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation) est bien connu de  
20 l'homme du métier.

Il peut être réalisé sur un produit obtenu après amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADN de chaque individu. Ce produit PCR est choisi pour couvrir la région génique du polynucléotide contenant le polymorphisme de type SNP étudié. Après la dernière étape dans  
25 le thermocycleur de la PCR, la plaque est alors placée sur un lecteur de fluorescence polarisée pour la lecture des bases marquées en utilisant les filtres d'excitation et d'émission spécifique des fluorophores. Les valeurs d'intensité des bases marquées sont reportées sur un graphe.

Les amorces respectivement sens et antisens pour l'amplification  
30 PCR, dans le cas du polymorphisme de type SNP de l'invention, peuvent facilement être choisis par l'homme du métier selon la position des

polymorphismes de type SNP conforme à l'invention.

Une analyse statistique de la fréquence de chaque allèle (fréquence allélique) codé par le gène comportant le SNP dans la population d'individus est alors effectuée, ce qui permet de déterminer l'importance de leur impact et leur répartition dans les différents sous-groupes et notamment, le cas échéant, les diverses ethnies qui constituent cette population d'individus.

Les données de génotypage sont analysées pour estimer les fréquences de distributions des différents allèles observés dans les populations étudiées. Les calculs de fréquences alléliques peuvent être réalisés à l'aide de logiciels tels SAS-suite® (SAS) ou SPLUS® (MathSoft). La comparaison des distributions alléliques du polymorphisme de type SNP de l'invention au travers des différentes ethnies de la population d'individus peut être réalisée au moyen des logiciels ARLEQUIN® et SAS-suite®.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention pour la recherche d'une variation dans la séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17 chez un individu.

#### Vecteur d'expression et cellule hôte

La présente invention a aussi pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins un polynucléotide conforme à l'invention.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés, comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les baculovirus, les papillonna virus comme SV40, les vaccinia virus, les adénovirus, les fox pox virus, les pseudorabies virus, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence nucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de

l'homme du métier, telles que, par exemple, celles qui sont décrites dans MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL (supra) Sambrook et al..

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences nucléotidiques de contrôle de la régulation de l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences nucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide de l'invention et la traduction d'un polypeptide de l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en œuvre.

Ainsi, par exemple, un signal de sécrétion approprié peut être intégré dans le vecteur recombinant pour que le polypeptide, codé par le polynucléotide de l'invention, soit dirigé vers la lumière du réticulum endoplasmique, vers l'espace périplasmique, sur la membrane ou vers l'environnement extracellulaire.

La présente invention a aussi pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant conforme à l'invention.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que celles décrites dans BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986 et MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, telles que la transfection par calcium phosphate, la transfection par DEAE dextran, la transvection, la microinjection, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes telles que les cellules de streptocoque, de staphylocoque, d'*E. coli* ou de *Bacillus subtilis*, des cellules de champignons telles que les cellules de levure et les cellules d'*Aspergillus*, de *Streptomyces*, des cellules d'insectes telles que les cellules de *Drosophila* S2 et de *Spodoptera* Sf9, des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 et des cellules humaines du sujet à traiter ou encore des cellules végétales.

Les cellules hôtes peuvent être utilisées, par exemple, pour exprimer un polypeptide de l'invention ou en tant que produit actif dans des compositions pharmaceutiques, comme on le verra ci-après.

## 5 Polypeptide

La présente invention a également pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 90 % d'identité, préférentiellement au moins 95 % d'identité, plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe  
10 constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
15 comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

Le polypeptide conforme l'invention peut également comprendre une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
20 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

Le polypeptide conforme l'invention peut tout particulièrement consister en une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué  
25 par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
30 comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 90 % d'identité, préférentiellement au moins 95 % d'identité, plus préférentiellement au moins 99 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe

5 constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) 10 comporte le polymorphisme de type SNP H57Q.

Le polypeptide conforme l'invention peut également comprendre une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 15 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

Le polypeptide conforme l'invention peut tout particulièrement consister en une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- 20 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

Chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) du polypeptide défini précédemment peut également comporter le polymorphisme de type SNP G45R.

25 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide ci-dessus décrit, dans lequel une cellule hôte définie précédemment est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon 30 les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate

d'ammonium, l'éthanol l'acétone ou l'acide trichloroacétique, l'extraction à l'acide; la chromatographie échangeuse d'ions; la chromatographie par phosphocellulose; la chromatographie par interaction hydrophobe; la chromatographie d'affinité; la chromatographie hydroxylapatite ou les  
5 chromatographies d'exclusion.

On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la  
10 conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

### Anticorps

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention  
15 d'un anticorps immunospécifique.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés ainsi que les fragments Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines.

20 Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne aussi un anticorps immunospécifique pour un polypeptide conforme à l'invention, tel que défini précédemment.

Un polypeptide selon l'invention, un de ses fragments, un  
25 analogue, un de ses variants ou une cellule exprimant ce polypeptide peuvent aussi être utilisés pour produire des anticorps immunospécifiques.

Le terme "immunospécifique" signifie que l'anticorps possède une meilleure affinité pour le polypeptide de l'invention que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

30 Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide de l'invention, d'un de ses fragments, d'un

analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polynucléotide chez un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des  
5 méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires, telles que la technique des hybridomes (Kohler et al., Nature (1975) 256 :495-497), la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4 :72) et la technique des hybridomes EBV (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER  
10 THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985).

Les techniques de production d'anticorps simple-chaîne telles que décrites, par exemple, dans US N° 4,946, 778 peuvent être également utilisées.

Des animaux transgéniques comme les souris, par exemple, peuvent être également utilisés pour produire des anticorps humanisés.

15

#### Agents interagissant avec le polypeptide de l'invention

La présente invention a également pour objet un procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 20 a) la mise en présence de cellules hôtes, telles que définies ci-dessus avec un agent à tester, et  
b) la détermination de l'effet activateur, ou inhibiteur, généré par l'agent à tester.

Un polypeptide conforme à l'invention peut ainsi être employé pour un procédé de criblage de composés qui rentrent en interaction avec celui-ci.  
25

Ces composés peuvent être des agents activateurs (agonistes) ou inhibiteurs (antagonistes) de l'activité intrinsèque d'un polypeptide selon l'invention. Ces composés peuvent également être des ligands ou des substrats d'un polypeptide de l'invention. Voir Coligan et al., Current Protocols in  
30 Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991).



En général, pour mettre en place un tel procédé, il est d'abord souhaitable de produire des cellules hôtes appropriées qui expriment un polypeptide conforme à l'invention. De telles cellules peuvent être, par exemple, des cellules de mammifères, de levures, d'insectes comme *Drosophila* ou de  
5 bactéries comme *E. coli*.

Ces cellules ou des extraits de membrane de ces cellules, sont alors mises en présence des composés à tester.

On peut ainsi observer la capacité de liaison des composés à tester avec le polypeptide de l'invention, mais également l'inhibition ou  
10 l'activation de la réponse fonctionnelle.

L'étape b) du procédé ci-dessus peut être mise en œuvre en utilisant un agent à tester marqué directement ou indirectement. Elle peut aussi comprendre un test de compétition, en utilisant un agent marqué ou non et un agent compétiteur marqué.

15 On peut également déterminer si un agent à tester conduit à la génération d'un signal d'activation ou d'inhibition sur des cellules exprimant le polypeptide de l'invention, en utilisant des moyens de détection appropriés, suivant le signal à détecter.

De tels agents activateurs ou inhibiteurs peuvent être des  
20 polynucléotides, et dans certains cas des oligonucléotides ou des polypeptides, comme des protéines ou des anticorps, par exemple.

La présente invention a aussi pour objet une méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 25 a) la mise en présence de cellules hôtes obtenues comme décrit ci-dessus avec un agent à tester, et  
b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur, généré par ledit polypeptide sur l'agent à tester.

Un agent activé ou inhibé par le polypeptide de l'invention est un  
30 agent qui répond, respectivement, par une activation ou une inhibition en présence de ce polypeptide. Les agents activés ou inhibés, directement ou

indirectement, par le polypeptide de l'invention peuvent consister en des polypeptides comme, par exemple, des récepteurs membranaires ou nucléaires, des kinases et plus préférentiellement des tyrosines kinases, des facteurs de transcription ou des polynucléotides.

5

#### Détection de maladies

La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide conforme à l'invention, comprenant :

- 10 a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'invention dans le génome du sujet, et/ou  
b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'invention chez un sujet.

15 La détection d'un polynucléotide et d'un polypeptide de l'invention peut ainsi permettre de savoir si un sujet est atteint ou risque d'être atteint ou, au contraire, présente une résistance partielle au développement d'une maladie, d'une indisposition ou d'un dérèglement tels que définis précédemment, relatifs à l'expression et/ou l'activité d'un polypeptide de l'invention.

20 La concentration "normale" d'un polypeptide peut être prédéterminée par l'homme du métier par des tests ou des essais conventionnels qui lui permettront d'identifier le seuil au-dessus ou en dessous duquel apparaît la sensibilité ou, au contraire, la résistance à la maladie, l'indisposition ou le dérèglement évoqué ci-dessus.

25 Le polynucléotide à tester peut être obtenu à partir d'échantillons biologiques du sujet à étudier, tels que des cellules, du sang, de l'urine, de la salive, ou à partir d'une biopsie ou d'une autopsie du sujet à étudier. L'ADN génomique peut être utilisé directement pour la détection ou après à une amplification par PCR, par exemple. L'ARN ou l'ADNc peuvent également être  
30 utilisés de façon similaire.

Il est ensuite possible de comparer la séquence nucléotidique d'un polynucléotide conforme à l'invention avec la séquence nucléotidique détectée dans le génome du sujet.

La comparaison des séquences nucléotidiques peut être effectuée  
5 par séquençage par des méthodes d'hybridation de l'ADN, par différence de mobilité des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse avec ou sans agents dénaturants ou par différence de températures de fusion. Voir Myers et al., Science (1985) 230 :1242. De telles modifications dans la structure de la séquence nucléotidique en un point précis peuvent également être révélées par  
10 des essais de protection aux nucléases, telles que l'ARNase et la nucléase S1 ou encore par des agents chimiques de clivage. Voir Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85 :4397-4401. Des sondes oligonucléotidiques comprenant un fragment d'un polynucléotide de l'invention peuvent également être utilisées pour conduire le criblage.

15 De nombreuses méthodes bien connues de l'homme du métier peuvent être utilisées pour déterminer l'expression d'un polynucléotide de l'invention et pour identifier la variabilité génétique de ce polynucléotide. Voir Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un  
20 polynucléotide conforme à l'invention pour effectuer un diagnostic génétique d'une maladie ou d'une résistance à une maladie liée à la présence, chez un ou plusieurs individus de la population humaine, de l'allèle mutant codé par le polymorphisme de type SNP fonctionnel conforme à l'invention.

Ces maladies peuvent être des dérèglements et/ou des maladies  
25 humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les  
30 maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux



central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la  
dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de  
blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies,  
l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite  
5 rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns,  
les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou  
encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, ces maladies peuvent être des hépatites  
chroniques B et C, des leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la  
10 leucémie myéloïde chronique, des myélomes multiples, des lymphomes  
folliculaires, des tumeurs carcinoïdes, des mélanomes malins, des carcinomes  
rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que  
des tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le  
sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

15 De même, la présence, l'absence et/ou la concentration de  
polypeptide selon l'invention peuvent aider au diagnostic d'une maladie, une  
indisposition ou un dérèglement ou, au contraire, la résistance à une maladie,  
une indisposition ou un dérèglement chez un sujet en prélevant un échantillon  
dérivé de ce sujet.

20 L'augmentation ou la diminution de l'expression du polypeptide  
peut être mesurée en quantifiant le niveau d'ARN codant pour ce polypeptide,  
suivant les méthodes bien connues de l'homme du métier, par exemple, par  
PCR, RT-PCR, protection à l'ARNase, Northern blot, et autres méthodes  
d'hybridation.

25 Il est également possible de déterminer la concentration en  
polypeptides de l'invention présents dans un échantillon biologique du sujet par  
des méthodes bien connues, par exemple, par radioimmunoessai, tests de  
liaisons compétitives, Western blot et tests ELISA.

Médicaments et traitements des maladies

La présente invention a aussi pour objet un médicament renfermant, à titre de principe actif, un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, un polypeptide conforme à l'invention peut être utilisé pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, les lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

Certains des composés permettant d'obtenir le polypeptide conforme à l'invention ainsi que les composés obtenus ou identifiés par ou à

partir de ce polypeptide peuvent également être utilisés pour le traitement thérapeutique du corps humain, c'est-à-dire à titre de médicament.

C'est pourquoi la présente invention a aussi pour objet un médicament contenant, à titre de principe actif un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un polynucléotide conforme à l'invention, d'un vecteur recombinant défini précédemment, d'une cellule hôte définie précédemment, d'un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les différents cancers comme, par exemple, les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme, par exemple, l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme, par exemple, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

Préférentiellement, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention peuvent être utilisés

pour la fabrication d'un médicament destinée à la prévention ou au traitement de différents dérèglements et/ou maladies humaines, tels que les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, les lymphomes  
5 folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

Le dosage d'un polypeptide et des autres composés de l'invention,  
10 utiles en tant que principe actif peut grandement varier et dépend du choix du composé, de l'indication thérapeutique, du mode d'administration, de la nature de la formulation, de la nature du sujet et du jugement du médecin.

Lorsqu'il est utilisé comme principe actif, un polypeptide conforme à l'invention peut être administré à des doses comprises entre 1 et 15 M UI  
15 (Unité Internationale) par prise. La dose recommandée peut être administrée par voie sous cutanée ou par voie intramusculaire, entre 1 à 5 fois par semaine, et ce sur une période pouvant s'échelonner entre 1 et 12 mois.

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à  
20 l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

25 Dans ces compositions pharmaceutiques, le principe actif est avantageusement présent à des doses physiologiquement efficaces.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple les  
30 comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les caramels, les suppositoires et de préférence les préparations injectables et les poudres pour

injectables. Ces formes pharmaceutiques peuvent être préparées selon les méthodes usuelles.

Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le dextrose, le glycérol, l'éthanol, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Le ou les principes actifs conforme à l'invention peuvent être employés seul ou en combinaison avec d'autres composés, tels que des composés thérapeutiques tels que d'autres IFNs $\alpha$ , voire d'autres cytokines comme les interleukines, par exemple.

Les différentes formulations des compositions pharmaceutiques sont adaptées suivant le mode d'administration.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par les différentes voies d'administration connues de l'homme du métier.

L'invention a également pour objet une composition de diagnostic qui renferment au moins un composé précité, tel qu'un polypeptide conforme à l'invention, un polynucléotide conforme à l'invention, un vecteur recombinant défini précédemment, une cellule hôte définie précédemment, un anticorps défini précédemment et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur d'un polypeptide conforme à l'invention, à titre de principe actif, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

Les excipients appropriés utilisés dans la composition de diagnostic sont généralement des tampons et des conservateurs.

La présente invention a également pour objet l'utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur défini précédemment et/ou
- b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'invention, et/ou



- c) d'un polynucléotide selon l'invention, et/ou
- d) d'une cellule hôte du sujet à traiter, définie précédemment, pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

5                   Ainsi, pour traiter un sujet qui a besoin d'une augmentation de l'expression ou de l'activité d'un polypeptide de l'invention, plusieurs méthodes sont possibles.

                  Il est possible d'administrer au sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide de l'invention et/ou d'un agent  
10 activateur et/ou activé tels que définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

                  Il est également possible d'augmenter la production endogène d'un polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide selon l'invention. Par exemple, ce polynucléotide peut être inséré dans un  
15 vecteur rétroviral d'expression. Un tel vecteur peut être isolé à partir de cellules ayant été infectées par un vecteur de plasmide rétroviral contenant de l'ARN codant pour le polypeptide de l'invention, de telle façon pour que les cellules transduites produisent des particules virales infectieuses contenant le gène d'intérêt. Voir Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic  
20 Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

                  Il est également possible d'administrer au sujet des cellules hôtes lui appartenant, ces cellules hôtes ayant été prélevées et modifiées, au préalable, de façon à exprimer le polypeptide de l'invention, comme décrit  
25 précédemment.

                  La présente invention concerne également l'utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur défini précédemment, et/ou
- b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps immunosécifique  
30 défini précédemment, et/ou
- c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide

conforme à l'invention,  
pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité, chez  
un sujet, d'un polypeptide conforme à l'invention.

Ainsi, il est possible d'administrer au sujet une quantité  
5 thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur et/ou d'un anticorps tels que  
définis précédemment, éventuellement en combinaison, avec un excipient  
pharmaceutiquement acceptable.

Il est également possible de diminuer la production endogène d'un  
polypeptide de l'invention par administration au sujet d'un polynucléotide  
10 complémentaire conforme à l'invention permettant d'inhiber l'expression d'un  
polynucléotide de l'invention.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Exemple 1 : Modélisation d'une protéine codée par un polynucléotide de  
15 séquence nucléotidique comportant le polymorphisme de type SNP g771c et de  
la protéine codée par la séquence nucléotidique du gène sauvage de référence

Dans une première étape la structure tridimensionnelle de IFN $\alpha$ -  
17 a été construite à partir de celle de l'IFN $\alpha$ -2 dont la structure disponible dans  
la base de données PDB (code 1ITF) et ce en utilisant le logiciel Modeler (MSI,  
20 San Diego, CA).

Le fragment polypeptidique mature a ensuite été modifié de façon  
à reproduire la mutation g771c.

Un millier d'étapes de minimisations moléculaires ont été  
conduites sur ce fragment muté en utilisant les programmes AMBER et  
25 DISCOVER (MSI : Molecular Simulations Inc.).

Deux suites de calculs de dynamiques moléculaires ont ensuite  
été effectuées avec le même programme et les mêmes champs de forces.

Dans chaque cas, 50000 étapes ont été calculées à 300°K,  
terminées par 300 étapes d'équilibration.

30 Le résultat de cette modélisation est visualisé sur les Figures 1 et  
2.

Exemple 2 : Etude de la fonction biologique de l'IFN $\alpha$ -17 G45R comparée à celle de l'IFN $\alpha$ -17 naturel

1) Clonage des IFN $\alpha$ -17 naturel et muté (G45R) dans le vecteur d'expression eukaryote pPicZ $\alpha$ -topo :

Les séquences nucléotidiques codant pour la protéine IFN $\alpha$ -17, naturelle et mutée sont amplifiées par PCR.

Les amorces PCR permettant une telle amplification sont :

- Amorce sens : TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

- Amorce antisens : TCAATCCTTCCTCCTTAATATTTTTTGC

Les produits PCR sont insérés dans le vecteur d'expression eukaryote pPicZ $\alpha$ -TOPO sous le contrôle du promoteur hybride AOX1 inducible par le méthanol (TOPO<sup>TM</sup>-cloning; Invitrogen Corp.).

Ce vecteur permet l'expression hétérologue de protéines eucaryotes dans la levure *Pichia pastoris*.

Après vérification de la séquence nucléotidique de la région du vecteur codant pour les protéines recombinantes, le vecteur est linéarisé par l'enzyme de restriction Pme1, la souche de levure *P. pastoris* (Invitrogen) est transformée avec ces vecteurs d'expression recombinants.

2) Expression hétérologue chez *P. pastoris* et purification des protéines IFN $\alpha$ -17 naturel et muté G45R:

Deux pré-cultures saturantes de 50 ml de milieu BMGY (2% Peptone, 1% extrait de levure, 1,34% YNB, 1% Glycérol, 100 mM phosphate de Potassium, 0,4 mg/Litre biotine pH 6,8) contenant un clone codant pour l'IFN $\alpha$ -17 naturel ou celui codant pour l'IFN $\alpha$ -17 G45R, ont été réalisées pendant 24 heures à 30°C à une agitation de 200 rotations par minute (rpm).

Lorsque la culture atteint une densité cellulaire correspondant à une densité optique de 5,0 à 600 nm, celle-ci est utilisée pour ensemercer, au 1/5, 200 ml de milieu BMMY (2% Peptone, 1% extraite de levure, 1,34% YNB, 0,5% Méthanol, 100 mM phosphate de Potassium, 0,4 mg/Litre biotine pH 6,8).



L'expression de la protéine est alors induite par le méthanol à une concentration finale de 0,5%, pendant 2 à 5 jours à 30°C. avec une agitation de la culture à 200 rpm.

Grâce à la présence de la séquence peptide signal "facteur alpha" (alpha factor), en amont de la séquence codante, les protéines sont secrétées par les levures dans le milieu de culture. Le facteur alpha est naturellement clivé lors de l'adressage.

La suspension de levure est clarifiée par centrifugation et le surnageant renfermant la protéine est purifiée par HPLC.

Dans la première étape de purification, une gel filtration permet de récupérer la protéine dans un tampon de 50 mM Tris-NaCl pH 8,0.

La présence de la protéine dans les fractions collectées est vérifiée, d'une part par électrophorèse de type SDS PAGE et d'autre part par immuno-détection par un anticorps spécifique dirigé contre la protéine IFN $\alpha$ -17.

A ce stade, la protéine d'intérêt est pure à hauteur de 80%.

La dernière étape de la purification consiste en une séparation des protéines sur colonne de chromatographie d'échange d'ions.

Les fractions contenant la protéine de fusion sont injectées sur une colonne échangeuse d'anions (ResourceQ 6,0 mL, Pharmacia) préalablement équilibrée en tampon Tris 50 mM pH 8. L'élution des protéines est réalisée par le passage d'un gradient entre 0 et 1 M NaCl dans le tampon Tris 50 mM pH 8.

La pureté de la protéine d'intérêt est estimée sur gel SDS/PAGE et les concentrations en protéine ont été mesurées par dosage BCA (acide bicinchoninique et sulfate de cuivre, Sigma).

Les protéines IFN $\alpha$ -17 naturel et IFN $\alpha$ -17 muté purifiées sont utilisés lors des tests fonctionnels qui consistent en une mesure de l'activité anti-proliférative de ces deux formes de l'IFN $\alpha$ -17 sur la croissance de la lignée cellulaire de type Daudi.

3. Evaluation de la capacité de l'IFN $\alpha$ -17 naturel et muté G45R à induire l'anti-prolifération des cellules de lymphoblastes humains de la lignée cellulaire Daudi Burkitt's

Ces tests sont effectués sur deux types d'IFN $\alpha$ -17 différents à savoir : l'IFN $\alpha$ -17 naturel et l'IFN $\alpha$ -17 G45R. Des cellules (lymphoblastes humains de la lignée cellulaire Daudi Burkitt's) préalablement cultivées dans du milieu RPMI 1640 (supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal et 2 mM de L-Glutamine) sont ensemencées en plaque 96 puits à la densité cellulaire de  $4 \times 10^4$  cellules/ puits.

Pour chacun des IFN $\alpha$ -17, des concentrations finales de 0,003 pM à 600 nM sont testées.

Huit cultures et donc mesures différentes sont faites en parallèle pour les deux protéines et ceci pour chaque concentration.

Les cellules Daudi sont ensuite cultivées pendant 66 heures à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>.

Après les 66 heures de croissance, l'effet anti-prolifératif de chaque IFN $\alpha$ -17 est estimé par le nombre de cellules vivantes présentant encore une activité des déshydrogénases mitochondriales. L'activité de ces déshydrogénases peut être détectée en présence de 12 mM de MTT (incubé 4 heures à 37°C), par le suivi de la densité optique à 550 nm correspondant à la formation de cristaux de formazan issus du clivage du sel de tétrazolium MTT.

L'activité d'anti-prolifération de l'IFN $\alpha$ -17 naturel ou muté (G45R) est basée sur les mesures de l'IC 50, correspondant à la concentration en IFN $\alpha$ -17 inhibant 50 % la croissance cellulaire.

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 3.

Les points de mesure pour chaque concentration de protéine IFN $\alpha$ -17 naturel et muté (G45R) représentés sur le graphe sont la moyenne pour chacune des quatre mesures prises sur les quatre cultures faites en parallèle pour chacune des protéines et des concentrations.

Ce test permet d'observer que l'IC 50 de l'IFN $\alpha$ -17 naturel est égale à 0,3 pM, alors que l'IC 50 de l'IFN $\alpha$ -17 muté G45R est égale à 1,5 pM.

Ainsi, l'activité anti-proliférative cellulaire est fortement inhibée (approximativement entre 5 à 12 fois moins) dans le cas de l'IFN $\alpha$ -17 muté G45R par rapport à l'IFN $\alpha$ -17 naturel.

**REVENDEICATIONS**

## 1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 90 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,  
- 808insA, ou

- 10 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

## 2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,  
- 808insA, ou

- b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

- 20 3. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune des séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,  
25 - 808insA.

4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique a) comporte le polymorphisme de type SNP g771c.

- 30 5. Polynucléotide isolé, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

REVENDICATIONS

## 1. Polynucléotide isolé comprenant :

- 5 a) une séquence nucléotidique ayant au moins 90 % d'identité avec la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que cette séquence nucléotidique comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- g771c,
  - 808insA, ou
- 10 b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

## 2. Polynucléotide isolé comprenant :

- 15 a) la séquence nucléotidique ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :
- g771c,
  - 808insA, ou
- b) une séquence nucléotidique complémentaire à une séquence nucléotidique sous a).

- 20 3. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune des séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,
- 25 - 808insA.

4. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique a) comporte le polymorphisme de type SNP g771c.

- 30 5. Polynucléotide isolé, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :



- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

6. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP H57Q.

7. Polynucléotide selon la revendication 6, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

8. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

9. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,
- 808insA.

10. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comme outil de génotypage.

11. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
5 comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

6. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- 10 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3,

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP H57Q.

7. Polynucléotide selon la revendication 6, caractérisé en ce que  
15 chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

8. Polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est composé d'une molécule d'ADN ou d'ARN.

9. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une  
20 quelconque des revendications 1 à 8, pour identifier, hybrider et/ou amplifier tout ou partie d'un polynucléotide consistant en la séquence ID SEQ N° 1 ou sa séquence codante, étant entendu que chacune de ces séquences comporte au moins l'un des polymorphismes de type SNP suivants :

- g771c,
- 25 - 808insA.

10. Utilisation de tout ou partie d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comme outil de génotypage.

11. Procédé de détermination de la fréquence du polymorphisme de type SNP d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à  
30 8, dans lequel on procède à un génotypage chez un individu ou dans une population d'individus.

12. Procédé de détermination selon la revendication 11, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

13. Procédé de détermination selon la revendication 12, dans lequel le miniséquençage est réalisé avec les amorces sens et antisens  
5 correspondant respectivement aux séquences nucléotidique ID SEQ N° 4 et ID SEQ N° 5.

14. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la recherche d'une variation de séquence dans la séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17 chez un individu.

10 15. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

16. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 15.

15 17. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 16 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

18. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 90 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

20 a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

25 19. Polypeptide selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
30 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

12. Procédé de détermination selon la revendication 11, dans lequel le génotypage est effectué par miniséquençage.

13. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la recherche d'une variation de séquence dans la  
5 séquence nucléotidique du gène IFN $\alpha$ -17 chez un individu.

14. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

15. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 14.

10 16. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'une cellule hôte selon la revendication 15 est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

17. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 90 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie  
15 dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
24 et 189 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
20 comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

18. Polypeptide selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et  
b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
25 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b)  
comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

19. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence d'acides aminés choisie  
30 dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et

20. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, et
- 5 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 189 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2, étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

21. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés  
10 ayant au moins 90 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3,
- 15 étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP H57Q.

22. Polypeptide selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- 20 b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

23. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 21 à 22, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

- 25 a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et
- b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

24. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et

- 30 b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

25. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospécifique,

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 169 de la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 2.

étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

5                    20. Polypeptide isolé comprenant une séquence d'acides aminés ayant au moins 90 % d'identité avec une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre  
10            24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3,  
étant entendu que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP H57Q.

21. Polypeptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par :

15            a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

22. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 20 à 21, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence d'acides aminés choisie  
20            dans le groupe constitué par :

a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3, et

b) la séquence d'acides aminés comportant les acides aminés compris entre 24 et 57 de ladite séquence d'acides aminés ID SEQ N° 3.

23. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 20 à  
25            22, caractérisé en ce que chacune des séquences d'acides aminés sous a) et b) comporte le polymorphisme de type SNP G45R.

24. Procédé d'obtention d'un anticorps immunospécifique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

30            25. Anticorps immunospécifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation d'un animal avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24.

26. Anticorps immunospécifique pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24.

5                   27. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, comprenant :

a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 16 avec un agent à tester, et

b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

10                   28. Agent activateur ou inhibiteur, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être identifié par la méthode selon la revendication 27.

29. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, comprenant :

15                   a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 16 avec un agent à tester, et

b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

30. Agent activé ou inhibé, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être identifié par la méthode selon la revendication 29.

20                   31. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, comprenant :

a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans le génome du sujet, et/ou

25                   b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, dans un échantillon biologique du sujet.

32. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24.

30                   33. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe

26. Procédé d'identification d'un agent activateur ou inhibiteur d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent à tester, et
- 5 b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par l'agent à tester.

27. Méthode pour l'identification d'un agent activé ou inhibé par un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, comprenant :

- a) la mise en présence de cellules hôtes selon la revendication 15 avec un agent à tester, et
- 10 b) la détermination de l'effet activateur ou inhibiteur généré par un polypeptide sur l'agent à tester.

29. Procédé de détection de l'expression et/ou de l'activité d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, comprenant :

- a) la détection de la présence ou de l'absence d'un polynucléotide selon l'une
- 15 quelconque des revendications 1 à 8 dans le génome du sujet, et/ou
- b) la détection de la présence, de l'absence et/ou d'une concentration prédéterminée d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, dans un échantillon biologique du sujet.

29. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un

20 polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

30. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les

25 lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les

30 colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou



constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas  
5 liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients  
10 dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

15 34. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 33, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les  
20 tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

25 35. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur recombinant selon la revendication 15, une cellule hôte selon la revendication 16, un anticorps selon la revendication 26 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 28.

30 36. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, d'un vecteur recombinant selon la revendication 15, d'une cellule hôte selon la revendication 16, d'un anticorps selon la revendication 26

d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres  
5 gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

31. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe  
10 constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit  
15 immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

32. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 25.

33. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication 25, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les  
25 différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales  
30 comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la

et/ou d'un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 28, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les différents cancers comme les carcinomes, les mélanomes, les lymphomes, les myélomes, les tumeurs cancéreuses ou non, les leucémies et les cancers du foie, du cou, de la tête et des reins, les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques telles que celles qui ne sont pas liées au système immunitaire comme l'obésité, les maladies infectieuses en particulier virales comme les hépatites B et C et le SIDA, les pneumonies, les colites ulcéraives, les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns, les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

37. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, d'un vecteur recombinant selon la revendication 15, d'une cellule hôte selon la revendication 16, d'un anticorps selon la revendication 26 et/ou d'un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 28, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins, les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

38. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un

schizophrénie et la dépression, le rejet de greffe de tissus ou d'organes, la cicatrisation de blessures, l'anémie en particulier chez les patients dialysés, les allergies, l'asthme, les scléroses multiples, l'ostéoporose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les maladies et les désordres auto-immuns,  
 5 les verrues génitales ou vénériennes, les désordres gastro-intestinaux ou encore les désordres liés aux traitements par chimiothérapie.

34. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, d'un vecteur recombinant selon la revendication 14, d'une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou d'un anticorps selon la revendication  
 10 25, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou le traitement de l'une des maladies choisies dans le groupe constitué par les hépatites chroniques B et C, les leucémies telles que la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie myéloïde chronique, les myélomes multiples, des lymphomes folliculaires, les tumeurs carcinoïdes, les mélanomes malins,  
 15 les carcinomes rénaux métastasés, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que les tumeurs qui apparaissent à la suite d'un déficit immunitaire, tel que le sarcome de Kaposi dans le cas du SIDA.

35. Composition pharmaceutique renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à  
 20 23, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 25, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

36. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif  
 25 au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur recombinant selon la revendication 14, une cellule hôte selon la revendication 15 et/ou un anticorps selon la revendication 25, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

30 37. Utilisation :

a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une

vecteur recombinant selon la revendication 15, une cellule hôte selon la revendication 16, un anticorps selon la revendication 26 et/ou un agent activateur et/ou inhibiteur selon la revendication 28, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

- 5                    39. Composition de diagnostic renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, un vecteur recombinant selon la revendication 15, une cellule hôte selon la revendication 16, un anticorps selon la revendication 26 et/ou un agent activateur et/ou  
10 inhibiteur selon la revendication 28, ainsi qu'un excipient approprié pharmaceutiquement acceptable.

40. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent activateur selon la revendication 28, et/ou  
15 b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24, et/ou  
c) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, et/ou  
d) d'une cellule hôte selon la revendication 16, cette cellule provenant du sujet à traiter,  
20 pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 18 à 24.

41. Utilisation

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent inhibiteur selon la  
25 revendication 28, et/ou  
b) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la revendication 26, et/ou  
c) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,  
30 pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité chez un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des

quelconque des revendications 17 à 23, et/ou

- b) d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, et/ou
  - c) d'une cellule hôte selon la revendication 15, cette cellule provenant du sujet à traiter,
- 5 pour préparer un médicament destiné à augmenter l'expression ou l'activité chez un sujet, d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

38. Utilisation :

- a) d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un anticorps selon la  
10 revendication 25, et/ou
- b) d'un polynucléotide permettant d'inhiber l'expression d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,

pour préparer un médicament destiné à diminuer l'expression ou l'activité chez un sujet d'un polypeptide selon l'une quelconque des  
15 revendications 17 à 23.



revendications 18 à 24.

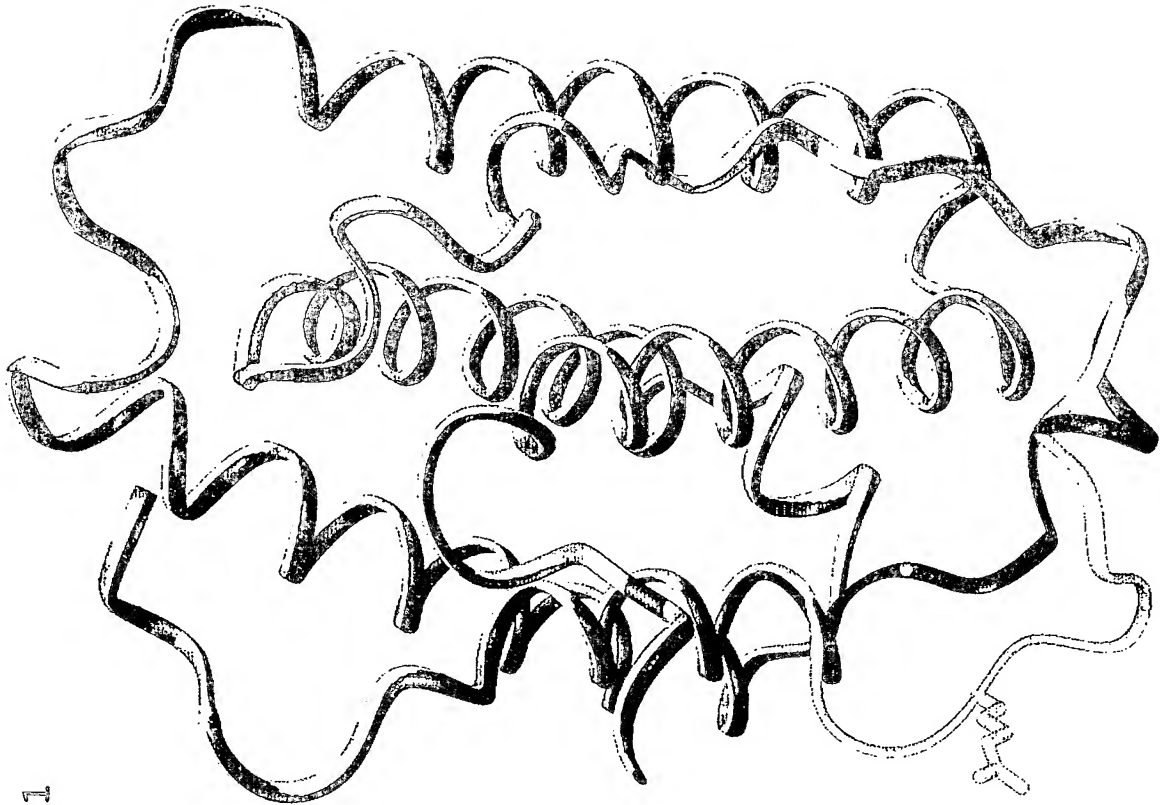


Figure 1



Figure 2

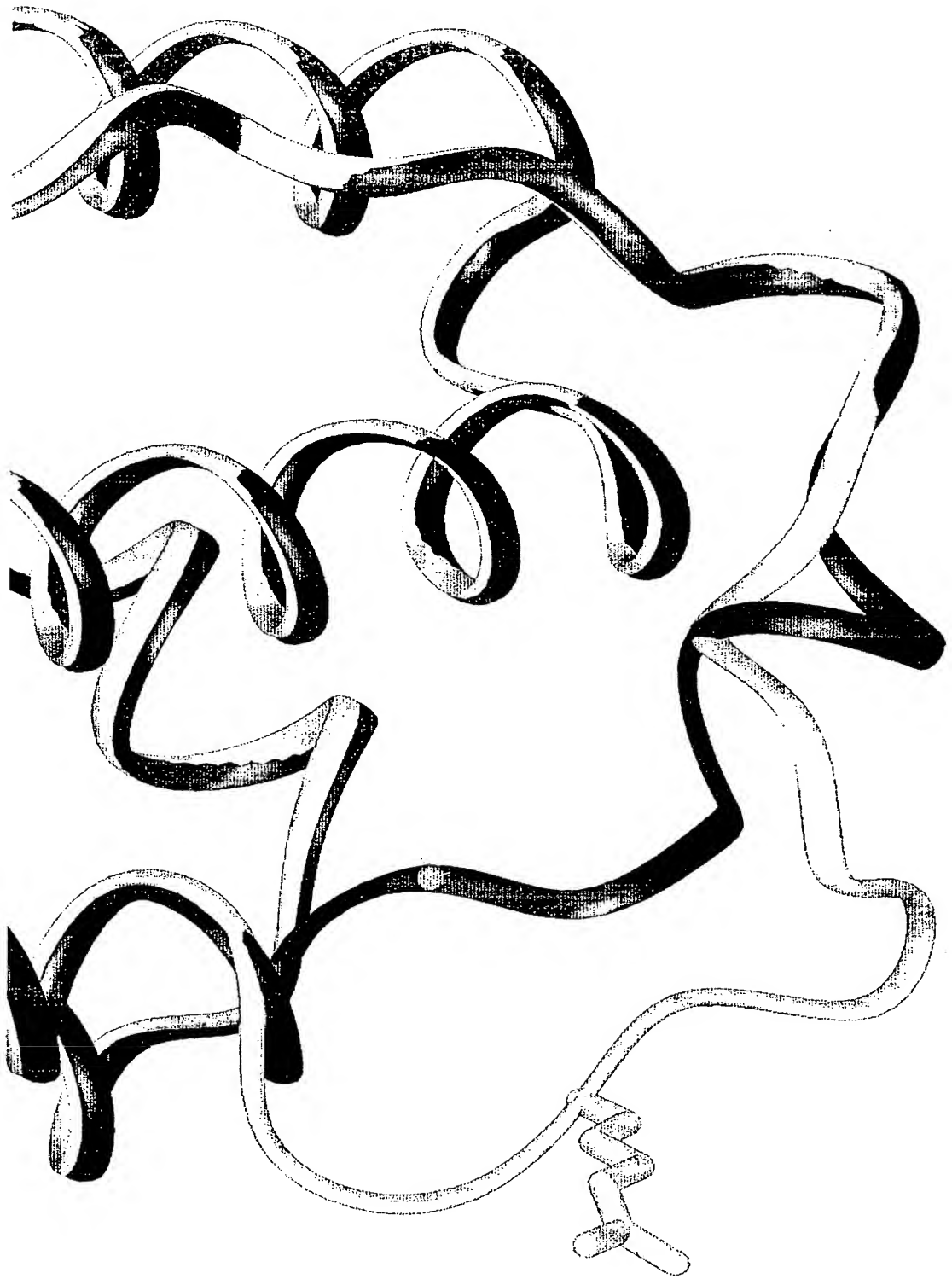
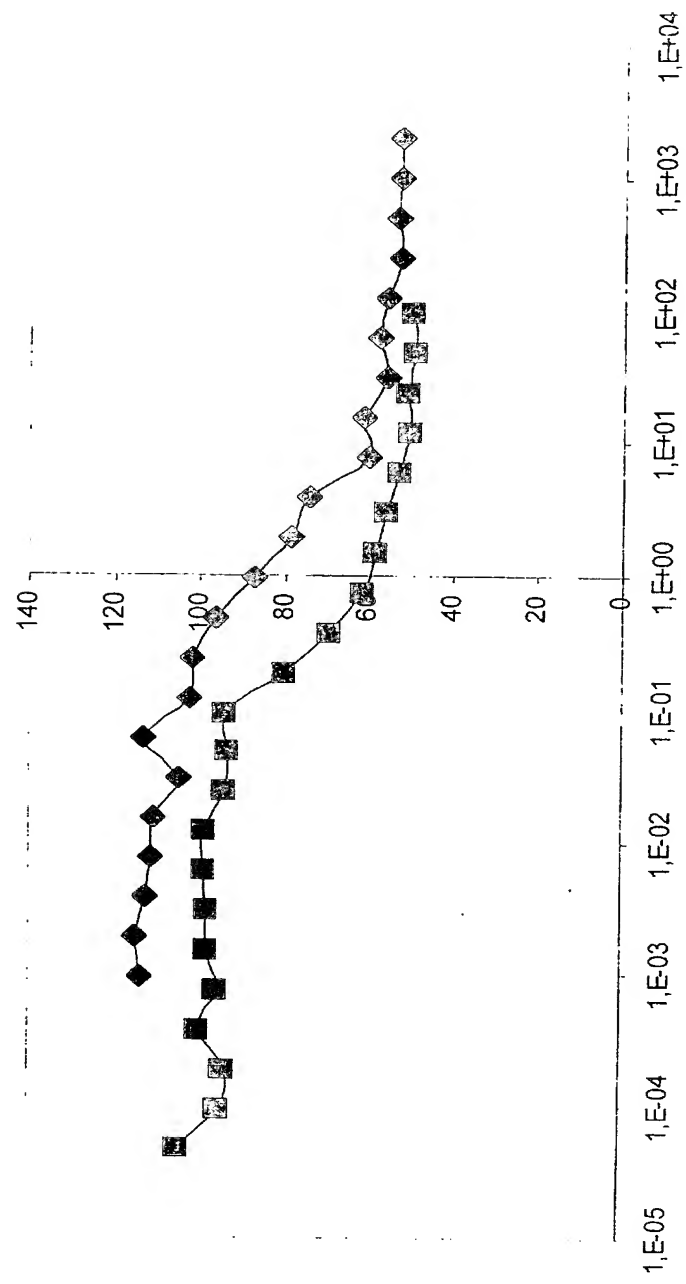


Figure 3



## LISTE DE SEQUENCES

<110> genodyssee

5 <120> Nouveaux polynucléotides et polypeptides du gène  
IFNa-17

<130> IFNa-17

10 <140>  
<141>

<160> 3

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 1873  
<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

	agcttcatac	actaagagaa	aaatttttaa	aaattattga	ttcttatttt	caggagtttt	60
	gaatgatcag	gtatgtaatt	atattcatat	tattaatgtg	tatttatata	gattttttatt	120
25	ttgcacaggt	actttgatac	aaaattttaca	tgaacaaatt	acactaaaag	ttattttcaca	180
	aatatactta	tcaagttaag	ttaaatgcaa	tagcttttaa	cttagatttt	aattttaactt	240
	tttctatcat	cattctttac	attaaataaa	aaaagcaaac	tttatagttt	ttatctataa	300
	agtagaggta	tacatagtat	acataaatac	atatgccaaa	tctgtgttat	taaaacttca	360
	tgaagatttc	gattacaaaa	aaataccgta	aaagactttg	agtgcagaag	aaaaatgggc	420
30	aatgatgaaa	aacaatgaaa	aacattctta	aacacatgta	gagagtgcag	aaagaaagca	480
	aaaacagaca	tagaaagtaa	aactagggca	tttagaaaat	ggaaattagt	atgttcacta	540
	tttaaggcct	atgcacagag	caaagtcttc	agaaaaccta	gaggccaaag	ttcaaggtta	600
	cccatctcaa	gtagcctagc	aacattttgca	acatcccaat	ggccctgtcc	ttttctttac	660
	tgatggccgt	gctgggtgctc	agctacaaat	ccatctgttc	tctaggctgt	gatctgcctc	720
35	agaccacag	cctgggtaat	aggagggcct	tgatactcct	ggcacaaatg	ggaagaatct	780
	ctcctttctc	ctgcctgaag	gacagacatg	actttggact	tcccaggag	gagtttgatg	840
	gcaaccagtt	ccagaagact	caagccatct	ctgtcctcca	tgagatgatc	cagcagacct	900
	tcaatctctt	cagcacagag	gactcatctg	ctgcttgagg	acagagcctc	ctagaaaaat	960
	tttccactga	actttaccag	caactgaata	acctggaagc	atgtgtgata	caggagggtg	1020
40	ggatggaaga	gactcccctg	atgaatgagg	actccatcct	ggctgtgagg	aaatacttcc	1080
	aaagaatcac	tctttatcta	acagagaaga	aatacagccc	ttgtgcctgg	gaggttgtca	1140
	gagcagaaat	catgagatct	ctctcttttt	caacaaactt	gcaaaaaata	ttaaggagga	1200
	aggattgaaa	actggttcaa	catggcaatg	atcctgattg	actaatacat	tatctcacac	1260
	tttcatgagt	tcctccattt	caaagactca	cttctataac	caccacgagt	tgaatcaaaa	1320
45	ttttcaaatg	ttttcagcag	tgtaaagaag	cgtcgtgtat	acctgtgcag	gcactagtac	1380
	tttacagatg	accatgctga	tgtctctgtt	catctattta	tttaaataat	tatttaatta	1440
	tttttaagat	ttaaattatt	tttttatgta	atatcatgtg	tacctttaca	ttgtggtgaa	1500
	tgtaacaata	tatgttcttc	atatttagcc	aatatattaa	tttccctttt	cattaaattt	1560
	ttactataca	aaattttctg	tgtttgttta	ttcttttaaga	taaaatgtcg	aggctgactt	1620
50	tacaacctga	cttaaaaata	tatgatttaa	ttaagttatc	tatcataatt	ttattcaagt	1680
	tattaaaaaa	acatttttct	gttactgggt	atatgttgcc	ttcaagatat	aaacgtgaac	1740
	ataaaatata	cagtccctgt	tctcttgtat	ctttgatgtt	tgtcaggaaa	gaaactctaa	1800
	aacaataata	atgctgaatt	aatatcagtg	atgctaactg	ctataatgtg	aggaagtaaa	1860
55	atacaatgaa	ttc					1873

<210> 2

<211> 38y  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 Met Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Met Ala Val Leu Val Leu Ser Tyr  
 1 5 10 15

10  
 Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu  
 20 25 30

Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser  
 35 40 45

15  
 Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu  
 50 55 60

Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu  
 65 70 75 80

20  
 His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser  
 85 90 95

25  
 Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu  
 100 105 110

Tyr Gln Gln Leu Asn Asn Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly  
 115 120 125

30  
 Met Glu Glu Thr Pro Leu Met Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg  
 130 135 140

Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser  
 145 150 155 160

35  
 Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser  
 165 170 175

40  
 Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys Ile Leu Arg Arg Lys Asp  
 180 185

45  
 <210> 3  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

50  
 Met Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Met Ala Val Leu Val Leu Ser Tyr  
 1 5 10 15

Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu  
 20 25 30

55  
 Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser  
 35 40 45

Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg Gln  
50 55



## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75820 Paris Cedex 10

Téléphone : 01 42 94 86 54 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BIF022983/FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0105516	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Nouveaux polynucléotides et polypeptides du gène IFN $\alpha$ -17.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
GenOdyssee			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ESCARY	
Prénoms		Jean-Louis	
Adresse	Rue	4 rue Moxouris	
	Code postal et ville	78150	LE CHESNAY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Le 24 avril 2001 Thierry CAEN N°98.0600 RINUY, SANTARELLI	